

NACHWEIS SAURER MUCOPOLYSACCHARIDE
IN MENSCHLICHEN BLUT- UND
KNOCHENMARKZELLEN

Wilfried Otto Eugen Keller

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551905_0044

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H. Spiess

NACHWEIS SAURER MUCOPOLYSACCHARIDE IN MENSCH-
LICHEN BLUT- UND KNOCHENMARKZELLEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Wilfried Otto Eugen Keller

aus

München

1975

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. J. Suschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Spiess

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.1975



Inhaltsverzeichnis

- I. Einleitung
- II. Eigene Untersuchungen
 - 1. Aufgabenstellung
 - 2. Material und Methode
 - A) Fluoreszenzmikroskop
 - B) Farbstoffe und Färbungen
 - 3. Ergebnisse: Versuche mit Fixierungsmitteln
 - A) Blutaussstriche von Kontrollkindern
 - B) Blutaussstriche von Mucopolysaccharidosen
 - C) Knochenmarksaussstriche nicht an MP-osen erkrankter Kinder
 - D) Knochenmarksaussstriche von MP-osen
 - 4. Diskussion
- III. Zusammenfassung
- IV. Literaturverzeichnis
- V. Lebenslauf

I. Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachweis saurer Mucopolysaccharide (sMPS) in Blut- und Knochenmarkzellen von Kindern, die an Mucopolysaccharidosen (MP-osen) erkrankt sind.

Nach dem heutigen Stand des Wissens, das in den letzten Jahren gewaltige Fortschritte erfahren hat (1,2,3,4,5,6,7, 8,9) liegen der Speicherkrankheit der MP-osen hereditäre Abbaustörungen von sMPS (10) in den Lysosomen zugrunde, die durch lysosomale Enzymdefekte hervorgerufen werden. Die Enzyme für Typ I, II, IIIa, IIIb, V und VI sind als lysosomale Enzyme bereits bekannt und außer für Typ VI auch identifiziert. (1,2,5,11,12, 13)

Das klinische Erscheinungsbild der einzelnen Typen ist nicht einheitlich, es bestehen zum Teil sogar erhebliche Unterschiede, besonders in den geistigen Fähigkeiten. Die nachfolgende Tabelle 1 soll auf die wichtigsten Symptome der einzelnen Formen in Biochemie und Klinik hinweisen. Gemeinsam zeichnen sich aber alle MP-osen durch Wachstumsstörungen, Neigung zu Umbilical- und Inguinalhernien (außer IV und V), Hornhauttrübungen (außer II und III), und, außer IV, zu Gelenkkontrakturen und Herzbeteiligung aus.

Nach Spranger (14) besteht die Wahrscheinlichkeit für ein Neugeborenes, an einer MP-ose zu leiden, etwa 1 : 25 000, d.h., jährlich würden in der Bundesrepublik 20 - 30 neue Fälle auftreten.

Tab. 1 Wichtige differentialdiagnostische Merkmale der bekannten MP-osen

	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV	Typ V	Typ VI
Wachstumsstörung	+++	++	+	+++	(+)	++ / +++
Geistige Retardierung	+++	+/++	+++	-	-	-
Beginn (Lebensalter)	1.	2.	4.	2.	5.-7.	2.-3./6.-7.
Gargoylgesicht	+++	+/++	+	-	-	+/++
Hornhauttrübung	+++	-	-	+	++	+
Hepatomegalie	+++	++	+	(+)	(+)	+
Herzbeteiligung	+++	++	(+)	-	+	++
Hernien	+++	+++	+	(+)	(+)	+
Gelenkkontrakturen	+++	+++	+	-	++	++
Gibbus	+++	++	-	+	-	++
vermehrte MPS-Ausscheidg.	D., H.	D., H	H,	K,	D, H	D,
metabolische Korrektur in I	-	+	+		+	+
Fibroblasten mit Typ II	+	-	+		+	+
III	+	+	+/-		-	+
IV		Typ IV in Zellkultur nicht nachweisbar				
V	-	+	+		-	+
VI	+	+	+		+	-
Enzymdefekt bekannt	+	+	+/+ 2Defekte	-	+	-

Eine rasche Diagnose wäre nicht nur für die betroffene Familie wegen einer genetischen Beratung wichtig, sondern in zunehmendem Maße auch für die erkrankten Kinder, da sich in absehbarer Zukunft vielleicht eine Substitutionstherapie mit korrektiven Enzymproteinen abzeichnet.

Die gegenwärtigen Diagnosemöglichkeiten lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Genaue Anamnese, klinischer Befund, Röntgenuntersuchungen des Skelets.
2. Biochemischer Nachweis einer erhöhten MPS-Ausscheidung im Urin.
3. Nachweis eines Enzymdefekts in der Fibroblastenkultur (16) und Bestimmung des MP-ose-Typs mittels metabolischer Kreuzkorrektur. (17)
4. Pränatale Diagnose durch Amnionzentese und nachfolgende Amnionzellkultur (außer IV).
5. Nachweis saurer MPS in Blut- und Knochenmarkzellen.

II. Eigene Untersuchungen

1. Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Mucopolysaccharide in menschlichen Blut- und Knochenmarkzellen spezifisch darzustellen, da die bisherigen Methoden unspezifisch und deshalb mehr oder weniger unzuverlässig sind.

Die gesuchte Methode soll dabei folgende Bedingung erfüllen:

1. Einfach Handhabung
2. Schnelle und sichere Ergebnisse
3. Gute Reproduzierbarkeit

2. Material und Methode

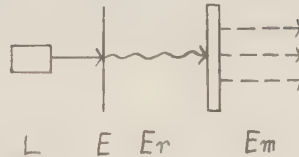
Da die sMPS in menschlichen Blut- und Knochenmarkzellen in sehr geringer Konzentration vorliegen, wurde nach einer Methode gesucht, mit der man selbst diese kleinen Mengen sichtbar machen kann. Mit dem Fluoreszenzmikroskop besitzt man ein geeignetes Instrument, mit dessen Hilfe nach Färbung mit fluoreszierenden Stoffen der Nachweis auch sehr geringer Farbstoffkonzentrationen möglich ist.

A) Zur Fluoreszenz und Fluoreszenzmikroskop

Es gibt Stoffe, die die besondere Eigenschaft besitzen, bei Bestrahlung mit UV-Licht oder sichtbarem Licht selbst eine Strahlung auszusenden, die langwelliger als das angewandte Erregerlicht ist und länger anhält = Lumineszenz. Hält die Strahlung aber nur so lange an, wie das Licht auf den Stoff einwirkt, so nennt man diese Erscheinung Fluoreszenz.

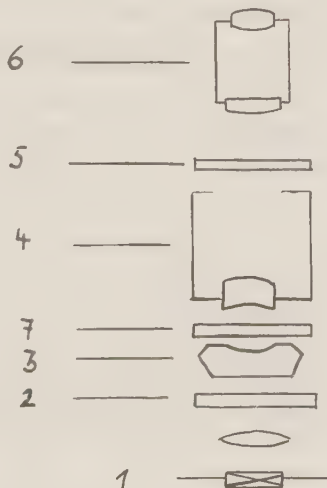
Abb. 1 Prinzip der Fluoreszenzanregung

L = Lampenhaus
 Er = Erregerlicht
 E = Erregerfilter
 Em = Emissionslicht



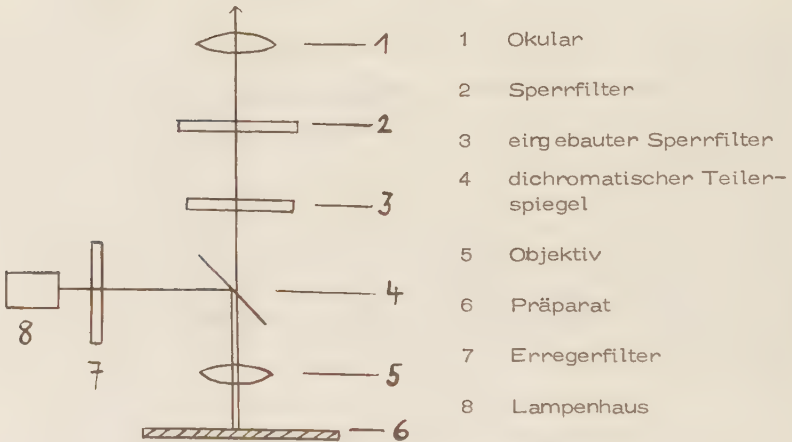
Bei der Fluoreszenz kann man eine Primärfluoreszenz, bei der der Stoff von sich aus fluoresziert, und eine Sekundärfluoreszenz unterscheiden, bei der die vorhergehende Färbung mit einem Fluorochrom, wie z.B. Pseudoisocyanin, notwendig ist. Die Anregung zur Fluoreszenz erfolgt bei den modernen Fluoreszenzmikroskopen entweder im Auflicht- oder im Durchlichtverfahren. Zum prinzipiellen Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops siehe Abb. 2

1 Lichtquelle
 2 Erregerfilter
 3 Kondensor
 4 Objektiv
 5 Sperrfilter
 6 Okular
 7 Objektisch



Die Untersuchung der Präparate, die mit Pseudoisocyanin gefärbt wurden, erfolgte in Auflichtfluoreszenz mit einer Xenon-Hochdrucklampe 14 V / 75 W in Verbindung mit dem Blauerregerfilter BG 12 (Leitz) und Sperrfilter TK 510 (Leitz). Die Xenonlampe lieferte polychromatisches Licht. (s. Abb. 3)

Abb. 3 Auflichtfluoreszenz



Wir verwendeten das Fluoreszenzmikroskop "Ortholux" (Leitz) mit dem Ölimmersiosobjektiv 100/1.30. Die Bilder wurden mit der dazugehörigen Systemkamera "Leica MDa" (Leitz) angefertigt.

B) Färbung und Farbstoff

ba) Die Färbung

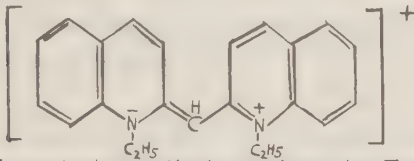
Als Farbstoff diente eine PIC-Lösung (5×10^{-4} molar), die 1:1 mit einem Acetat-Puffer (pH 4,6) versetzt wurde.

Färbegang:

Entfetten der KM-Ausstriche mit Lignoïn ^R	4 Stunden
Fixation mit 9-Aminoacridinhydrochlorid 0,4% in 50% Äthanol (Fa. Merck, Katalog Nr. 1112)	20 Minuten
Lufttrocknung	
Färbung mit PIC (pH 4,6)	30 Minuten
Lufttrocknung und Auswertung der Ausstriche am Färbetag	

bb) Der Farbstoff

Pseudoisocyanin (PIC) Abb.4



ist ein metachromatisch reagierender Farbstoff. Nach P. Ehrlich versteht man unter Metachromasie die Änderung der Farbe eines Farbstoffs, z.B. bei der Bindung an ein Gewebe. Diese Farbänderung kann nach ihren Ursachen in 3 Typen aufgeteilt werden:

1. Die Bindung an ein Gewebe wirkt ähnlich wie ein Wechsel des Lösungsmittels. Die beobachtbaren Absorptionsbanden werden dabei im Sichtbaren parallel verschoben.
2. Durch Aneinanderlagerung gleicher oder ähnlicher Farbstoffmoleküle kann eine durchgreifende Änderung des Absorptionsspektrums bestimmter Farben erzielt werden, so daß langwellige Banden verschwinden und kurzwellige verstärkt werden bzw. neu auftreten. Diese Erscheinungen werden ver-

ursacht durch Assoziation des Farbstoffes, entweder durch höhere Konzentration, oder durch Begünstigung einer solchen Assoziation bei der Bindung der Farbstoffmoleküle an Matrizen, z.B. Gewebs-
oberflächen. Beispiel hierfür wäre Acridinorange (28,29,30), wo-
bei die gleichzeitige Änderung des Fluoreszenzspektrums und der
Fluoreszenzfarbe auffällt.

3. In besonderen Fällen führt die Assoziation von Farbstoffmolekülen
zur Umformung des Spektrums mit dem Auftreten einer neuen,
langwelligeren, schmalen und sehr intensiven Absorptionsbande.
Beispiele dafür sind die Farbstoffe der Pseudocyaninreihe (18)
s. Abb. 5

Dieser Farbstoff wurde zur Untersuchung verwendet.

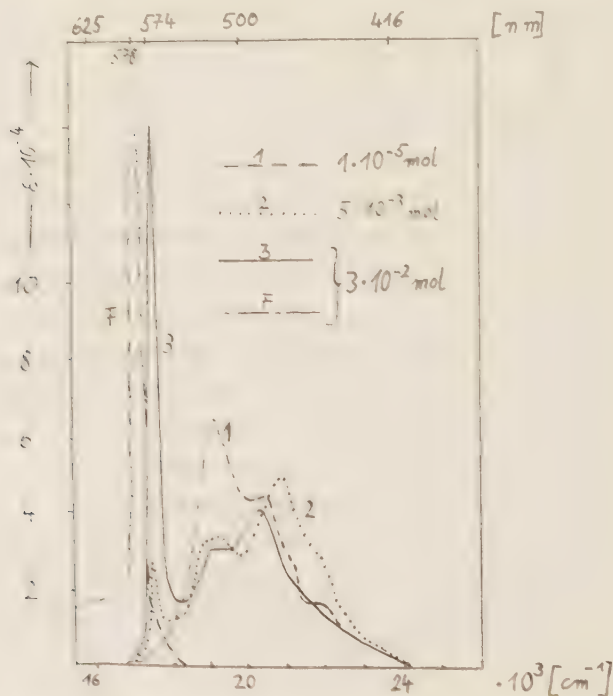


Abb. 5 Absorptions- und Fluoreszenzbanden bei PIC in Abhängig-
keit vom Assoziationsgrad (27)

Die Intensität und Lage der Fluoreszenz der Assoziationsbande hängt von der Konzentration des Farbstoffes und der Art und der Konzentration der Matrize ab. Als Matrize kommen bei PIC elektronegative Gruppen, wie Phosphatreste an Nucleinsäuren oder Sulfat- und Carboxylgruppen an Mucopolysacchariden in Frage.

bc) Vorgänge bei der Färbung mit PIC

1. Der positiv geladene Farbstoff wird an negativ geladene Teilchen gebunden, z.B. MPS, DNA (Coulombsche Wechselwirkung)
2. Der Abstand dieser Teilchen muß so klein sein, daß die einzelnen gebundenen Farbstoffmoleküle nicht mehr unabhängig voneinander angeregt werden können. Daraus resultiert eine Störung bei der Absorption, die die Ursache für die Bandenverschiebung ist.

PIC fluoresziert bei 20°C nur im aggregierten Zustand, da im monomeren Zustand die gesamte zugeführte Energie strahlungslos über die Torsionsschwingungen der beiden Chinolinringe abgegeben wird (siehe Strukturformel). Die Bandenverschiebung infolge Assoziation erfolgt bei PIC ins langwelligere. (siehe bb2 und bb3)

Da die Lage der Absorptions- und Fluoreszenzbande von PIC abhängt von der Art und der Konzentration der Matrize und der Konzentration des PIC, lassen sich Veränderungen bei den Matrizenparame- tern wegen der außerordentlich schmalen Fluoreszenzbande von PIC sehr leicht feststellen. (s. Abb. 5)

bd) Sonstiges

Bei jedem Patienten wurde wie folgt verfahren:

1. Entnahme des Blutes bzw. des Knochenmarks und anschließendes Ausstreichen auf Glasobjektträger.
2. Färbung mit PIC (pH 4,6) bei Blut- und KM-Ausstrichen, bei KM-Ausstrichen vorheriges Entfetten mit Ligno^Rin
3. Mikroskopische Untersuchung am Färbetag
4. Zählung von Granula in den jeweils untersuchten Zellen
5. Photographieren von Zellen

Fotographiert wurde mit dem Diafilm "Ektachrom High-speed". Die Belichtungszeit betrug je nach der Fluoreszenzintensität 14 - 18 Sekunden.

3. Die Ergebnisse

In zahlreichen Vorversuchen wurde der Einfluß von verschiedenen Fixierungsmitteln getestet. Dabei stellte sich heraus, daß sowohl bei der Anwendung von Methanol, Formalin, basischem Bleiacetat als auch Cetylpyridiniumchlorid kein Nachweis von MPS im Zellplasma erbracht werden konnte. Erst nach Anwendung von 9-Aminoacridinhydrochlorid (19, 20) konnten MPS in menschlichen Blut- und KM-Zellen dargestellt werden.

Ein spezifischer Nachweis von sMPS ist jedoch nur bei Pufferung des Farbstoffes auf pH 4,6 möglich, weil die MPS, außer Hyaluronsäure, die nur in einem höheren pH-Bereich dissoziiert vorliegt, bei diesem pH ebenso wie DNA noch dissoziiert sind, während andere fluoreszierende Stoffe in diesem pH-Bereich nicht mehr dissoziieren.

Ein Hinweis dafür, daß bei gesunden Kindern in Blut- und Knochenmarkzellen keine sMPS gespeichert werden, ergibt sich aus der Beobachtung, daß bei pH 4,6 im Zellplasma der hier untersuchten Blutaussstriche keine Granula gesehen wurden. Eine Ausnahme stellten lediglich die basophilen Granulozyten mit ihrem Heparin Gehalt dar.

A) Es wurden Blutaussstriche von 31 Kindern mit verschiedenen Erkrankungen untersucht. Keines dieser Kinder litt an einer MP-ose.

Bei ihnen wurden keine fluoreszierenden Granula im Cytoplasma von Rundkernigen (Lymphocyten, Monocyten) gefunden. Siehe Tabelle 2

Tabelle 2

Blutausstriche von Kindern, die nicht an Mucopolysaccharidosen erkrankt sind.

Fixierung: 9-Aminoacridin-hydrochlorid

Färbung: PIC, pH 4,6

Pat.Nr.	MPS-Einschlüsse in Monocyten + Lymphocyten	Basophile Granulocyten auf 100 Rundkernige
1.	keine	6
2.	keine	-
3.	keine	-
4.	keine	-
5.	keine	2
6.	keine	2
7.	keine	2
8.	keine	2
9.	keine	-
10.	keine	-
11.	keine	-
12.	keine	-
13.	keine	3
14.	keine	-
15.	keine	-
16.	keine	-
17.	keine	-
18.	keine	-
19.	keine	-
20.	keine	-
21.	keine	2
22.	keine	-
23.	keine	-
24.	keine	-
25.	keine	-
26.	keine	1
27.	keine	1
28.	keine	-
29.	keine	1
30.	keine	3
31.	keine	-
32.	keine	-

B) Blutausstriche von MP-osen I-III

Nach der Gruppe der Kontrollkinder wurden 10 Patienten mit MP-osen derselben Untersuchung unterzogen. Bei diesen Patienten zeigten 5 - 49 % aller rundkernigen Zellen MPS-Einschlußkörper.

Tabelle 3

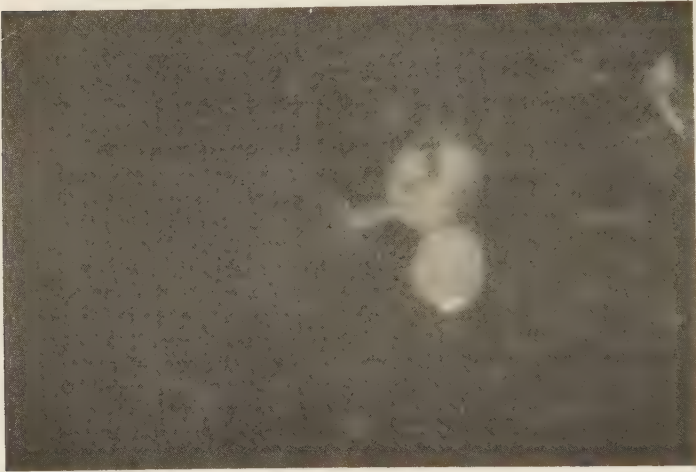
Blutausstriche von Kindern mit MP-osen

Fixierung: 9-Aminoacridin-hydrochlorid

Färbung: PIC (pH 4,6)

Pat.Nr.	MP-ose	MPS-Einschlüsse	Basoph.auf 100 Rundkernige
1.	I	11	-
2.	I	5	2
3.	I	22	-
4.	I	10	2
5.	II	20	2
6.	II	36	-
7.	II	13	-
8.	II	5	-
9.	III	8	-
10.	III	49	-

Abb. 6 MPS-Einschlußkörperchen in einem Lymphocyten



C) Es wurden Knochenmarkausstriche von Kindern untersucht, die nicht an einer MP-ose litten und bei denen aus anderen Gründen eine Knochenmarkspunktion erfolgte.

Nach Entfetten mit Ligroin^R erfolgte der weitere Arbeitsgang wie bei den Blutausstrichen.

Es konnten bei diesem Patientenkollektiv in den KM-Zellen keine Plasmagranulierungen entdeckt werden.

Tabelle 4

Fixierung: 9- Aminoacridin-hydrochlorid

Färbung: PIC (4,6)

Pat.Nr.	MPS-Einschlüsse in Erythroblasten oder anderen KM-Zellen
1.	keine
2.	keine
3.	keine
4.	keine
5.	keine
6.	keine
7.	keine
8.	keine
9.	keine
10.	keine
11.	keine
12.	keine
13.	keine
14.	keine
15.	keine
16.	keine
17.	keine
18.	keine

D) KM-Ausstriche von Kindern mit MP-osen

Bisher konnten nur 2 Patienten untersucht werden, beide Kinder weisen den MP-ose Typ II auf.

Abb. 7 KM-Ausstrich einer MP-ose II



2 Einschußkörperchen in einem Erythroblasten (Abb.7)

Es fanden sich bei den Patienten neben Plasmagranula in retikulären Zellen sowie in Lymphoblasten, cyten und Monocyten stets runde bis strichförmige Einlagerungen in Erythroblasten, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit MPS entsprechen. Da in diesem pH-Bereich auch DNA fluoresziert, wäre es möglich, daß diese Einschußkörper in den Erythroblasten z.B. Kernabsprengungen oder Kernreste (Jolly-Körper) darstellen könnten. In einer zum Vergleich angefertigten Pappenheim-Aufnahme wurde aber nie ein Hinweis auf Jolly-Körper gefunden. Auch litten diese Patienten weder an megaloblastischer Anämie, noch war bei ihnen eine Milzextirpation durchgeführt worden.

Tabelle 5

KM-Ausstriche von Patienten mit MP-osen

Pat.Nr.	MP-ose	MPS-Einschußkörper In Erythroblasten
1.	II	+
2.	II	+

Fixierung: 9- Aminoacridin-hydrochlorid

Färbung: Papanicolaou

Bei der Mutter eines Patienten von Typ II wurde aus Anlaß einer genetischen Beratung ebenfalls eine KM-Punktion durchgeführt. Auch bei ihr fanden sich wie bei den hier untersuchten MP-osen von Typ II charakteristische Einschlußkörper in den Erythroblasten.

4. Diskussion

Erstmals wurde von Alder (21) 1938 bei einem 9-jährigen Mädchen, das mit Scharlach aufgenommen worden war, eine eigenartige Granulierung in den Leukocyten beschrieben, die auch nach Heilung des Scharlachs weiterbestanden. Es konnte sich also nicht um toxische Granulationen handeln. Die typischen Merkmale waren: Neutrophilie mit grober, dunkler Granulation, die Eosinophilen wegen basophiler Granulation nicht von Basophilen zu unterscheiden, auch die Lymphocyten und Monocyten füllten durch größere azurophile Granulationen auf. Im Vordergrund standen aber die Veränderungen bei Neutrophilen und Eosinophilen. Im Krankheitsverlauf zeigten sich die gleichen Veränderungen in den Frühformen der myeloischen Reihe. Auch der 7-jährige Bruder wies die gleiche Anomalie auf. Wenige Jahre später trat bei dem Patienten eine Störung des Skelettwachstums auf. Die histologische Untersuchung zeigte enchondrale Ossifikationsstörungen mit sekundären Folgen wie zum Beispiel Dauerbrüche, Geröllcysten und Arthrose.

1941 beschrieb auch Reilly (24) bei 4 Patienten mit Ganglyliomus eine grobe Granulation in weißen Blutzellen, die in 60 - 90% der Leukocyten vorhanden waren; in Lymphocyten und Monocyten fand er sie wesentlich seltener.

Weitere Granulationsanomalien, die jedoch graduell verschieden waren (22), wurden dann erst um Beginn der 50-iger Jahre von Jordans in Holland (1947), Brugsch (1949), Dawe (1950) und Valentine (1950) wieder gesehen. Alle bis dahin gefundenen Granulationsanomalien gingen mit unterschiedlichen Knochenwachstumsstörungen einher. Die Granulationsanomalien bestanden nach Abschluß des Knochenwachstums weiter, d.h., sie waren nicht von den Knochenstörungen verursacht. Der Grund mußte also in einer gemeinsamen Genschädigung liegen.

Gasser konnte 1950 (23) bei einem 10 Monate alten Säugling nur in Lymphocyten diese Granula sehen. Diese Beobachtung stand im Gegensatz zu den Befunden von Alder, Reilly et al. Im Knochenmark bestanden die gleichen Befunde, auch reticulo-histio-cytäre Zellen zeigten in wechselndem Maße Einschlüsse.

Da an der Existenz von Granula in weißen Blutzellen von Patienten, die an MP-osen erkrankt sind, kein Zweifel besteht, versuchte Hansen (26) an Hand morphologischer Merkmale der Granula den sehr verschiedenen Fundorten in den Blutzellen bestimmte Krankheitstypen der MP-osen und Mucopolipidosen zuzuordnen. Die für einen bestimmten Typ angeblich charakteristischen Zellen nannte er "Markerzellen". Bei Typ IV sollen die Neutrophilen, bei VI die Neutrophilen und Eosinophilen typisch sein. Hier konnten leider keine Patienten dieser Typen untersucht werden. Hansen hält auf Grund der Beschreibung das Geschwisterpaar von Alder für den MP-ose-Typ VI. Alder selbst ordnete später (22) seine zwei Patienten einer Spätform der Morquio-Erkrankung zu.

Aber auch bei anderen MP-ose-Typen will Hansen MPS-Einschlüsse in Neutrophilen gesehen haben, die er aber für nicht spezifisch genug hielt, da sie angeblich bei allen MP-osen anzutreffen seien. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnten aber nie MPS-Einschlüsse in Granulocyten nachgewiesen werden, außer bei Basophilen.

Der Grund mag darin liegen, daß Hansen die Pappenheim-Färbung anwandte, bei der schon geringe pH-Änderungen zu mehr oder weniger auffälliger Granulierung führen.

Helen Muir (25) korrelierte MP-osen mit Einschlußkörpern in Lymphocyten. Wie auch Gasser (23) fand sie Einschlußkörper nur in Lymphocyten, wenn die Ausstriche mit Toluidinblau gefärbt waren. Aber auch die Toluidinblaufärbung ist nicht spezifisch, denn selbst Hansen sagt von ihr: "Toluidin blue is certainly an attractive agent, but capricious and full of secrets. After times of frustrations we agreed, that toluidin blue is a mystery rather than a stain."

Die hier angewandte Methode besitzet alle diese Nachteile nicht. Zum erstenmal wurde beim Nachweis von MPS in Blutzellen 9-Aminoacridin-hydrochlorid verwendet, das eine sehr gute Fixierung der leicht löslichen MPS zeigt (19,20).

Zum anderen muß der Puffer auf die pH-Bereiche eingestellt werden, in denen außer DNA nur noch MPS in nachweisbaren Konzentrationen vorliegen.

Wenn man über eine Ausrüstung mit Fluoreszenzmikroskop und dazugehöriger Fotoausrüstung verfügt, so sind MP-osen mit 9-Aminoacridin-hydrochlorid und PIC (pH 4,6) sehr schnell und sicher zu diagnostizieren. Ein weiterer Vorteil dieser neuen Methode besteht darin, daß die mühevollen Sammlung des 24-Stunden-Urins entfällt.

Wenn sich dieses Verfahren an einem größeren Patientenkollektiv bestätigt, stünde ein neuer und in seiner Aussage sicherer Screening-Test zur Verfügung.

Bisher konnten in Erythroblasten nie MPS gesehen werden. Im Knochenmark fanden sich bei MP-osen Einschlußkörper, die MPS entsprechen, und die möglicherweise pathognomonisch für MP-osen sind. Auch bei der Mutter eines Patienten mit Typ II konnten Einschlußkörperchen in Erythroblasten gesehen werden.

Wenn sich dies an einer größeren Zahl beweisen ließe, hätte man einen Heterocygotentest, der von erheblicher Bedeutung wäre. Bisher lassen sich Heterocygote weder durch eine erhöhte MPS-Ausscheidung im Urin noch durch eine erhöhte $^x\text{SO}_4^-$ -Speicherung in der Fibroblastenkultur erfassen. Nach Passarge (15) ist ein Heterocygotentest nur für den x-chromosomal vererbten Typ II von Bedeutung, da die Hälfte aller Söhne genetisch gefährdet sind. Bei den autosomal rezessiven MPS-Speicherkrankheiten wäre eine Heterocygotenerfassung nur bei Heiraten zwischen Verwandten von Interesse.

III. Zusammenfassung

Bei 10 Patienten mit MP-osen der Typen I,II und III konnten mittels geeigneter Fixierung (9-Aminoacridinhydrochlorid) und Färbung (PIC, pH 4,6) in 5 - 49 % aller Rundkernigen MPS-Einschlußkörper nachgewiesen werden.

Ein MPS-Nachweis in Neutrophilen konnte nicht erbracht werden.

Bei 2 Patienten des Typ II wurde nach einer Knochenmarkspunktion in den Erythroblasten zum erstenmal MPS-Einschlußkörper beschrieben. Auch bei einer Genträgerin von Typ II konnten in den Erythroblasten des Knochenmarks dieselben Beobachten gemacht werden. Daraus könnte in Zukunft ein Heterocytogentest entstehen, falls sich bei einer größeren Zahl die gleichen Ergebnisse erbringen ließen.

IV. Literaturverzeichnis

- 1 Bach, G.R. Friedmann, E.F. Neufeld, B. Weissmann:
The defect in the Hurler and Scheie syndromes:
deficiency of α -L-iduronidase. *Proc.nat.Acad.Sci.*
(Wash) 69, (1972) 2048
- 2 Bach, G., F.Eisenberg jr., McCantz, E.F. Neufeld,: The
defect in the Hunter syndrome: deficiency of sulfiduronate
sulfatase. *Proc.nat.Acad.Sci.* (Wash) 70 (1973) 2134
- 3 Cantz, M.A. Chrambach, G. Bach, E.F. Neufeld: The Hunter
corrective factor. Purification and preliminary chracterization.
J.biol.Chem. 247 (1972) 5456
- 4 von Figura, K.M. Lögering, G. Mersmann, H.Kresse,:
Sanfilippo B disease: a serum assay for detection of homo-
cygotes, heterocygotes and normal individuals in three families.
J. Pediat. 83 (1973) 607
- 5 Kresse H., E.F. Neufeld,: The Sanfilippo A corrective factor.
Purification and mode of action. *J.biol.Chem.* 247 (1972) 2164
- 6 Kresse, H., Mucopolysaccharidosis IIIA: deficiency of a
heparin sulfamidase in skin fibroblasts and leucoocytes. *Biochem.*
biophys. Res.Comm. 54 (1973) 1111

- 7 Matalon R., A. Dorfmann,: Hurler's syndrome, an α -L-iduronidase deficiency. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 47 (1972) 959
- 8 O'Brien, J.S., : Sanfilippo syndrome: profound deficiency of α -acetylglucosaminidase activity in organs and skin fibroblasts from type B patients. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash)* 69 (1972) 1720
- 9 Sjöberg, I, L.A. Fransson, R. Matalon, A. Dorfmann,: Hunter's syndrome: a deficiency of L-idurono-sulfatase. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 54 (1973) 1125
- 10 Brante, G.,: Cargoylism-a mucopolysaccharidosis. *Scand. J. clin. Lab. invest.* 4 (1952) 43
- 11 Barton, R.W., E.F. Neufeld,: The Hurler corrective factor. Purification and some properties. *J. biol. Chem.* 246 (71) 7773
- 12 Brown, D.H.,: tissue storage of mucopolysaccharides in Hurler-Pfaundler's disease. *Proc. nat. Acad. Sci.* 43 (1957) 783
- 13 Wendel, U.W. Wöhler, H.W. Rüdiger, E. Passarge: Aspekte der metabolischen Korrektur von Zellen mit pathologisch gesteigerter Mucopolysaccharidspeicherung. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 353 (1972) 1575
- 14 Spranger, J., The systemic mucopolysaccharidoses. *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.* 32 N.F. (1972) 165
- 15 E. Passarge, U. Wendel, W. Wöhler, H.W. Rüdiger: Krankheiten infolge genetischer Defekte im lysosomalen Mucopolysaccharid-Abbau

- 16 Fratantoni, J.C., C.W. Hall, E.F. Neufeld: The defect in Hurler's and Hunter's syndromes: faulty degradation of mucopolysaccharide. *Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.)* 60 (1968) 699
- 17 Fratantoni, J.C., C.W. Hall, E.F. Neufeld: Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. *Science* 162 (1968) 570.
- 18 Schiebler, T.H. und Schiessler, S.,: Über den Nachweis von Insulin mit den metachromatisch reagierenden Pseudoisocyaninen. *Histochemie* 1 (1959) 445
- 19 M.R. Parwaresch und D. Arndt: Fixierung der basophilen Granulocyten mit 5-Aminoacridin-hydrochlorid. *Klin.Waschr.* 53 (1975) 185
- 20 G. Williams, D.S. Jackson: Two organic fixatives for acid mucopolysaccharides. *Stain Technology* 31 (1956) 189
- 21 A. Alder,: Über konstitutionell bedingte Granulationsveränderungen der Leukocyten. *Dtsch.Arch.kli.Med.* 183 (1938/39) 372
- 22 A. Alder,: Konstitutionell bedingte Granulationsveränderungen der Leukocyten und Knochenveränderungen. *Schweiz. med. Wschr.* 80 (1950) 1095
- 23 Gasser C., Diskussion zu Alder: *Schweiz.med.Waschr.* 80 (1950) 1095
- 24 Reilly W.A.,: The granules in the Leucocytes in gargoylism *Amer.J.Dis.Child.* 62, (1941) 489
- 25 H. Muir: The diagnostic value of isolated urinary mucopolysaccharides and of lymphocytes inclusions in gargoylism.

Arch.Dis.Childh, 38 (1963) 358

- 26 Hansen., H.G.: Hematologic studies in mucopolysaccharidoses and mucolipidoses. In: The Fourth Conference on the Clinical Delineation of Birth Defects, Birth Defects: Original Article series: Vol III, No 3 (The National Foundation, New York 1972) 115
- 27 Gschwind., K.,: Zur Struktur von Pseudoisocyaninaggregaten, Diss. 74, TU München
- 28 Strugger,S: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Acridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. J.Z.med.Naturw. 73 (1940) 97
- 29 Zanker, V.: Über den Nachweis definierter reversibler Assoziat des Acridinorange durch Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in wässriger Lösung. Z.phys.Chemie 199 (1952) 225
- 30 Zanker, V. und Scheibe, G.: Physikochemische Grundlagen der Metachromasie. Acta Histochemica Supplementband I (1958), 6

Herrn Priv. Doz. Dr. H.-J. Suschke gilt mein aufrichtiger Dank für die Überlassung des Themas und die stets gewährte freundliche Unterstützung und Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. H. Spiess danke ich für die Genehmigung, die Arbeit an der Kinderpoliklinik der Universität ausführen zu dürfen.

Frau Rohde und Herrn Dr. rer. nat. K. Gschwind danke ich ebenfalls für ihre Hilfe.

Zuletzt sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Übernahme der Materialkosten gedankt.

V. Lebenslauf

Am 7.1.1948 wurde ich als Sohn des Juristen Dr. Wilfried Keller und seiner Ehefrau Getrud Keller, geb. Zermann, in Hafenlohr/Marktheidenfeld geboren.

In Marktheidenfeld besuchte ich von 1954 - 1958 die Volksschule. Im Jahr 1958 trat ich in das Neusprachliche Siebold-Realgymnasium in Würzburg über. Wegen des Umzugs meiner Eltern nach München wechselte ich 1962 an das Wittelsbacher Gymnasium, an dem ich 1967 das Abitur ablegte. Im Wintersemester 1967 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Zahnmedizin. Im März 1970 wurde ich zum Doppelstudium Zahnmedizin/Humanmedizin zugelassen.

Im Sommersemester 1973 legte ich das Staatsexamen in Zahnmedizin ab, im Frühjahr 1975 folgte das Staatsexamen in Humanmedizin.

